

瑞氏木霉 EG I 3'-UTR 对基因在酿酒酵母中表达的影响*

肖志壮 吴志红 王 婷 曲音波** 高培基 汪天虹

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要:将纤维素降解菌丝状真菌瑞氏木霉内切葡聚糖酶 I (EG I) 全长 cDNA 克隆于酿酒酵母 HI58 中得到表达。重组酿酒酵母产生的 EG I 的最适 pH 值为 5.0, 最适作用温度为 50℃ ~ 60℃。EG I cDNA 中的 3'-非翻译区(3'-UTR)序列的删除导致 EG I 基因在酵母菌中没有活性产物表达。通过 RT-PCR 技术检测 EG I mRNA 转录水平的结果表明, 带有 3'-UTR 的 EG I cDNA 在酿酒酵母中具有明显的转录产物生成, 但删除 3'-UTR 之后的 EG I cDNA 却检测不到转录产物。这说明 EG I 的 3'-UTR 对基因在酵母菌中的表达具有重要作用。

关键词: 瑞氏木霉, 内切葡聚糖酶 I, 3'-非翻译区, 基因表达, 酿酒酵母

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0587-05

丝状真菌瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是目前发现的对纤维素降解最有效的菌种之一。它能分泌大量不同的纤维素酶, 通过相互之间的协同作用降解纤维素^[1]。纤维素酶系含有三大类组分: 内切葡聚糖酶 (endoglucanase, EG)、纤维二糖水解酶 (cellobiohydrolase, CBH) 和葡萄糖苷酶^[2]。目前最高产的瑞氏木霉菌株产生的胞外蛋白质为 40g/L, 绝大部分为纤维素酶, CBH I 占 60%, CBH II 占 20%, EG I 占 10%^[3]。研究表明, 低剂量的 EG 可用于纺织、印染和洗涤工业中, 进行棉布的各种表面处理^[4]。近年来, 工业上应用的一些酵母因其具有生长速度快及其他的一些特性而成为表达异源蛋白的理想宿主系统^[5]。研究影响异源蛋白在酵母中表达水平的因素对于构建理想的基因工程菌具有重要意义。本文从瑞氏木霉 cDNA 文库中克隆出表达水平高的 EG I 基因, 转化到酿酒酵母中进行表达, 发现 EG I cDNA 的 3'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 对 EG I 基因在酿酒酵母中的表达水平具有显著的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验中所用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 各菌株及质粒的遗传特征见表 1。

1.2 培养基

培养 *S. cerevisiae* 时根据菌株特性采用不同的合成培养基 SC、Ura 缺陷选择性合成培

* 国家自然科学基金资助 (39970392)

** 通讯联系人 Tel: 0531-8565234 E-mail: lifezds@sdu.edu.cn

作者简介: 肖志壮, 男, 1967 年生, 山东荣成人, 山东大学微生物系 98 级博士生, 主要从事分子生物学研究。

收稿日期: 2000-12-28, 修回日期: 2001-05-31

培养基 SC-Ura^[6]。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Properties of heredity	Selective marker	Sources
<i>S. cerevisiae</i> H158	leu2 - 3, 112 ura3 - 52 trp1 - 289 hsi4 - 519		VTT, Finland Biotechnol., Finland
H158 - <i>eglF</i>	H158 harboring EG I fulllength cDNA from <i>T. reesei</i>	Ura	Present paper
H158- <i>eglD</i>	H158 harboring EC I cDNA without 3'-UTR	Ura	Present paper
pAJ401	5.55kb, with ura3, 2 μ plasmid origin and PGK promoter and terminator of <i>S. cerevisiae</i>	Ura	VTT, Biotechnol, Finland
<i>T. reesei</i> QM9414 cDNA library	<i>S. cerevisiae</i> H158 as host, pAJ401 as expression vector	Ura	VTT, Biotechnol., Finland

1.3 分子克隆用酶及试剂盒

限制性内切酶 *Eco*RI、*Xho*I、T4 DNA 连接酶、*pfu* DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒均为 Promega 公司产品,凝胶回收试剂盒购自 Roehringer Mannheim 公司。使用方法参照厂商提供的说明书。

1.4 酵母的转化

参照文献[6]方法转化酿酒酵母 H158。

1.5 酵母质粒和总 DNA 的提取

采用 Hoffman 方法进行^[7]。

1.6 大肠杆菌转化、质粒的提取及分子克隆操作

按常规方法进行^[8]。

1.7 基因序列测定

按双脱氧法进行^[8]。

1.8 内切葡聚糖酶平板活性检测

将构建的重组酿酒酵母涂布于含有 0.5% CMC 的 SC-Ura 平板上,30℃ 培养 3d 后,用 0.1% 的刚果红染液染色 1h,然后用 1mol/L NaCl 脱色约 40min,挑选产生透明水解圈的阳性克隆,平板划线挑取单菌落进行菌种保存。

1.9 内切葡聚糖酶活性测定

取 0.1mL 适当稀释的 EG I 培养物上清液,加入含 0.5mL 0.5% CMC 的 50mmol/L 不同 pH 值的醋酸或磷酸缓冲液中,在一定温度下保温 60min,用 Somogyi 方法测定还原糖。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增引物的设计

根据文献[2]发表的瑞氏木霉 EG I 的 cDNA 序列和表达载体 pAJ401 的相应序列,设计了 3 条 PCR 引物,分别用以克隆全长 EG I cDNA 片段和不含 3'-UTR 序列的 EG I 结构

基因片段。

引物 1:5'-TCTCGAATTCATGGCGCCCTCAGTTACAC-3';

引物 2:5'-GCGCGAATTCGCTCTAAAGGCATTGCG-3';

引物 3:5'-TGTGGAATTGTGAGCGGA-3'。

2.2 带有 3'-UTR 的 EG I 全长 cDNA 的扩增及在酿酒酵母中的表达

从 *T. reesei* cDNA 文库中提取质粒作模板,以引物 1、3 为上下游引物,进行 PCR 扩增。反应条件优化后确定为 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 4min。经过 30 个循环的扩增后,得到 1.75kb 的 DNA 片段特异扩增带(图 1),它包含一段载体序列和含有 3'-UTR 的 EG I 全长 cDNA 序列。这与预期大小相符。因为 EG I 基因内部和 PCR 扩增产物中所含有的一段 pAJ401 载体序列中各有一个 *Xho* I 酶切位点,所以 PCR 产物需经 *Eco*R I 和 *Xho* I 不完全双酶切后,1.5kb 的 EG I 基因片段用凝胶回收后,连接于表达载体 pAJ401 的相应酶切位点之间。连接产物转化酿酒酵母 H158,涂 SC-Ura 平板,于 30℃ 培养 3d 后,进行平板活性检测。结果显示,平板上所有转化子都具有 CMCase 活性,而且水解圈大小均匀。这说明采用高保真 pfu DNA 聚合酶扩增出的 EG I 基因都可得到活性表达。随机挑选 3 株 EG I 阳性克隆,分别命名为 H158-eg1F1~3。

2.3 EG I 基因序列测定与分析

选 H158-eg1F1 提取质粒对基因进行序列测定,将我们克隆的瑞氏木霉内切葡聚糖酶 I 基因序列与 GenBank 中的相应基因序列比较。结果发现,两基因 cDNA 序列完全相同^[2]。EG I cDNA 的开放阅读框架由 1380bp 组成。它编码 459 个氨基酸,其中 N-末端 22 个氨基酸为信号肽,成熟的 EG I 含有 437 个氨基酸。我们的数据表明,采用高保真度的 pfu DNA 聚合酶经过 30 个循环的 PCR 扩增后,所得 1.5kb 的 DNA 片段中没有发生突变。这种方法可以直接克隆已知序列的基因。

2.4 重组 EG I 的最适作用温度和 pH 值

因为 EG I 的信号肽在酿酒酵母中可以使成熟的 EG I 蛋白有效地分泌到酵母细胞外,所以重组酿酒酵母经液体培养后,上清液可直接用于重组 EG I 酶学性质的分析。测定了重组酿酒酵母 H158-eg1F 所产生的 EG I 的最适作用温度和 pH 值。由于 EG I 基因克隆到表达载体 pAJ401 的酵母 PGK 启动子之后,EG I 的表达受 PGK 启动子的控制,因此酶的表达可在葡萄糖培养基中进行。于 30℃ 培养 3d 后,离心取上清测定内切葡聚糖酶活力。测定结果表明,H158-eg1F 所产生的 EG I 的催化活性在 50℃ ~ 60℃, pH 5.0 时最高。此结果与文献报道相符^[9]。

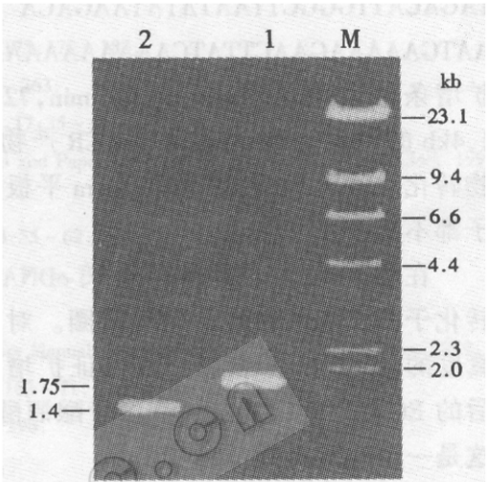


图 1 全长 EG I cDNA 和删除 3'-UTR 后的 EG I cDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR products of full-length EG I cDNA and EG I cDNA without 3'-UTR

M. λ DN/ *Hind* III marker; 1. Products of full-length EG I cDNA; 2. EG I cDNA without 3'-UTR.

2.5 3'-UTR 对 EG I 基因在酿酒酵母中表达的影响

我们在用 PCR 扩增 EG I cDNA 时就删除了它的 5'-UTR 序列,为了研究 3'-UTR 对 EG I 在酿酒酵母中表达的影响,我们采用质粒 pAJ401-eg1F 为模板,引物 1、2 为上下游引物,删除 EG I cDNA 中的 3'-UTR 146 个核苷酸全部序列(5'-TAGAGCGTT-GACTTGCCTCTGGTCTGTC CAGACGGGGGCACGATAGAA-TGCGGGCACGCAG GGAGCTCG-TAGACATTGGGCTTAATATATAAGACA TGCTATGTTGTATCTACATTAGCAAATGACAAACA AATGAAAAAGAACTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'),但保留了完整的结构基因序列。PCR 扩增条件为:94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 3.5min。经过 30 个循环后,得到了一条预期的 1.4kb 的特异扩增带(图 1)。PCR 产物经限制酶切后连接到表达载体 pAJ401 上。连接产物转化酿酒酵母 H158,涂 SC-Ura 平板。对转化子进行平板测活的结果显示,所有的转化子都不产生水解圈。

在使用 PCR 法对 EG I 全长 cDNA 进行扩增并克隆于酿酒酵母中表达时,得到的全部转化子都产生大小均匀的水解圈。对 DNA 测序结果与平板活性检测结果都说明了高保真度的 pfu DNA 聚合酶可以保证扩增后的 EG I 基因产物均有活性。然而,删除 3'-UTR 后的 EG I 完整结构基因克隆于酿酒酵母中却没有一个转化子表现出内切葡聚糖酶活性,这是一个非常有趣的现象。

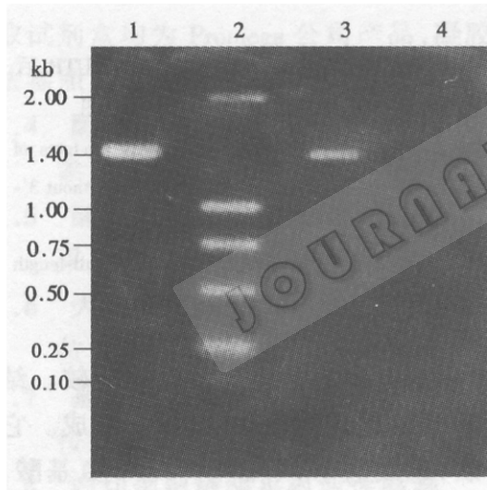


图 2 EG I mRNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Agarose electrophoresis of the products of EG I mRNA amplified by RT-PCR

1. Total DNA of the yeast harboring EG I cDNA without 3'-UTR as PCR template; 2. DNA molecular marker DL-2000; 3. Total RNA of the yeast harboring full-length EG I cDNA as RT-PCR template; 4. Total RNA of the yeast harboring EG I cDNA without 3'-UTR as RT-PCR template.

2.6 RT-PCR 检测 EG I mRNA 转录水平

为了分析删除 3'-UTR 后的 EG I 没有活性酶蛋白表达的原因,我们使用引物 1、2 为上下游引物,通过 RT-PCR 方法检测带有 3'-UTR 的 EG I cDNA 和删除 3'-UTR 后的 EG I cDNA 在酿酒酵母中的转录水平。

当以带有缺失 3'-UTR 后的 EG I 基因酿酒酵母总 DNA 和以带有 3'-UTR 的 EG I 基因的酵母总 RNA 为 PCR 扩增模板时都有特异 PCR 产物(图 2 中第 1、3 泳道),但是,当以带有缺失 3'-UTR 后的 EG I 基因酿酒酵母总 RNA 为 PCR 扩增模板时却没有特异 PCR 产物出现(图 2 中第 4 泳道)。删除了 3'-URT 的 EG I 基因在酿酒酵母中检测不到转录产物,这说明 EG I 的 3'-UTR 序列中可能存在与基因转录调控或 mRNA 稳定性有关的因子,同时也解释了带有删除了 3'-UTR 的 EG I 基因的酿酒酵母在 CMC 平板上不产生水解圈的原因。

Sreekrishna 曾报道过基因的 5'-UTR 的碱基序列及长度对外源蛋白质在酵母菌中的表达起关键作用^[5]。我们也将瑞氏木霉 EG III 的 5'-UTR 删除后,使 EG III 在酿酒酵母中的表达水平提高了 5.3

倍^[10]。本文中,删除瑞氏木霉 EG I cDNA 的 3'-UTR 导致单独的 EG I 结构基因序列在酿酒酵母中不转录表达活性酶蛋白。这一结果暗示,EG I 的 3'-UTR 对其基因在酿酒酵母中的表达起重要作用。这提示我们在构建酵母工程菌表达外源蛋白时需要考虑外源因自身的 3'-UTR 的调控作用。

参 考 文 献

- [1] Stahlberg J, Johansson G, Petterson G, et al. *Eur J Biochem*, 1988, **173**: 179 ~ 183.
- [2] Penttila M, Lehtovaara P, Nevalainen H, et al. *Gene*, 1986, **45**: 253 ~ 263.
- [3] Uusitalo J M, Nevalainen H, Harkki A M, et al. *J Biotechnol*, 1991, **17**: 35 ~ 50.
- [4] Teeri T T. 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver: Publication Clerk, 1998. A171 ~ 173.
- [5] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp EK E, et al. *Gene*, 1997, **190**: 55 ~ 62.
- [6] Johnston J R. *Molecular Genetics of Yeast*. Oxford: Oxford University Press, 1994. 121 ~ 130.
- [7] Hoffman C S, Winston F. *Gene*, 1987, **57**: 267 ~ 272.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. *J Biotechnol*, 1998, **65**: 163 ~ 71.
- [10] 肖志壮, 王 婷, 汪天虹, 等. *微生物学报*, 2001, **41**(4), 391 ~ 396.

EFFECT OF 3'-UTR OF EG I FROM *TRICHODERMA REESEI* ON ITS GENE EXPRESSION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* *

Xiao Zhizhuang Wu Zhihong Wang Ting Qu Yinbo** Gao Peiji Wang Tianhong

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Several industrial yeast are developed as ideal expression hosts for the production of the commercially useful proteins. The expression levels in yeast cells of the heterologous proteins are affected by the regulation factors of the genes themselves. The full-length cDNA coding for EG I from *Trichoderma reesei*, the cellulose-degrading filamentous fungus, was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* H158. EG I produced by the recombinant *S. cerevisiae* exhibits maximal activity at 50°C ~ 60°C, pH 5.0. It was observed that removal of the 3'-untranslated region (3'-UTR) from EG I cDNA resulted in no active EG I produced by recombinant yeast. RT-PCR analysis indicated that unlike the yeast cells harboring full-length EG I cDNA, there was no detectable EG I mRNA in the yeast cells harboring EG I cDNA without 3'-UTR. The data suggested that 3'-UTR is important for the expression of EG I in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Trichoderma reesei*, Endoglucanase I, 3'-UTR, Gene expression, *Saccharomyces cerevisiae*

* This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (39970392)

** Corresponding author